



团 体 标 准

T/CGTA 11—2025

大豆转基因成分的快速检测 环介导等温扩增（LAMP）检测法

Rapid detection for genetically modified components in soybeans

——Loop-mediated isothermal amplification detection method

2025 - 08 - 01 发布

2025- 08 - 01 实施

中国粮食商业协会 发 布

目 次

1 范围	- 3 -
2 规范性引用文件	- 3 -
3 术语、定义和缩略语	- 3 -
3.1 术语和定义	- 3 -
3.2 缩略语	- 3 -
3.2.1	- 3 -
CP4-EPSPS	- 3 -
3.2.2	- 3 -
G2-EPSPS	- 3 -
3.2.3	- 4 -
G10evo-EPSPS	- 4 -
4 原理	- 4 -
5 仪器及材料	- 4 -
6 试剂	- 4 -
6.1 试剂	- 4 -
6.2 溶液配制	- 6 -
7 样品制备	- 6 -
7.1 抽样和制样	- 6 -
7.2 样品前处理	- 6 -
8 样品测定	- 7 -
8.1 试液配制	- 7 -
8.2 核酸扩增	- 7 -
8.3 结果判定	- 7 -

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由百沃特（天津）生物技术有限公司提出。

本文件由中国粮食商业协会归口。

本文件起草单位：百沃特（天津）生物技术有限公司、中粮营养健康研究院有限公司、北大荒粮食集团有限公司、黑龙江象屿农业物产有限公司、通标标准技术服务（青岛）有限公司。

本文件主要起草人：马增彬、钱承敬、仇磊、刘晓萌、王健、李俊、于旭德、韩冀、杨若松、龚雅云。

大豆转基因成分的快速检测 环介导等温扩增（LAMP）检测法

1 范围

本文件规定了大豆中转基因成分环介导等温扩增快速检测方法的术语和定义、原理、仪器与设备、试剂与材料、样品制备、检测方法和判定规则的要求。

本文件适用于大豆中转基因成分CP4-EPSPS、G2-EPSPS和G10evo-EPSPS核酸序列的快速检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 5491 粮食、油料检验 扦样、分样法

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB/T 19495.4 转基因产品检测 实时荧光定性聚合酶链式反应（PCR）检测方法

GB/T 19495.7 转基因产品检测 抽样和制样方法

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

GB/T 19495.7界定的术语和定义适用于本文件。

3.2 缩略语

3.2.1

CP4-EPSPS

土壤农杆菌CP4蛋白基因和5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase.

3.2.2

G2-EPSPS

荧光假单胞杆菌G2蛋白基因和5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *Agrobacterium tumefaciens* strain CP4 Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase。

3.2.3

G10evo-EPSPS

耐辐射球菌G10evo蛋白基因和5-莽草酸-3-磷酸合成酶基因 *Deinococcus radiodurans* CP4G10evo Product: herbicide tolerant form of 5-enolpyruvulshikimate-3-phosphate synthase。

4 原理

根据大豆内源基因、外源基因（CP4-EPSPS、G2-EPSPS和G10evo-epsps）序列设计特异性内引物和外引物各一对，建立LAMP反应体系。引物特异性识别目标序列，利用Bst酶启动循环链置换反应，在特异性目标序列启动互补链合成，在同一链上互补序列周而复始形成有很多环的花椰菜结构的茎-环DNA混合物，恒温反应结束后根据添加的染色液颜色变化情况进行结果判定。

5 仪器及材料

- 5.1 水浴锅或加热模块：温度可控制在 $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。
- 5.2 离心管：5 mL、1.5mL、200 μL 。
- 5.3 4联排冻干管及管盖：0.2 mL。
- 5.4 移液器：量程10 μL -100 μL ；量程100 μL -1000 μL ；量程1 mL -5 mL。
- 5.5 天平：感量0.01 g。
- 5.6 容量瓶：1 L。
- 5.7 烧杯：1 L。
- 5.8 玻璃棒：20 cm。
- 5.9 真空冷冻干燥机。
- 5.10 涡旋振荡器。
- 5.11 计时器。

6 试剂

6.1 试剂

除另有说明外，所有试剂均为分析纯或生化试剂，实验室用水应符合GB/T 6682中的一级水的要求。

6.1.1 1 M Tris-HCl (pH 8.0)。

- 6.1.2 0.5 M EDTA（乙二胺四乙酸二钠，pH 8.0）。
- 6.1.3 NaCl（氯化钠）。
- 6.1.4 CTAB（十六烷基三甲基溴化铵）。
- 6.1.5 1 M HCl（盐酸）。
- 6.1.6 10 M NaOH（氢氧化钠）。
- 6.1.7 dNTPs溶液：每种核苷酸浓度10 mmol/L。
- 6.1.8 Bst DNA聚合酶大片段（如：NEB公司或具有同等效果的DNA聚合酶）：酶浓度8 U/ μ L。
- 6.1.9 10×ThermoPol Reaction Buffer：含200 mmol/L Tris-HCl（pH 8.8）、100 mmol/L KCl、100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、20 mmol/L MgSO_4 、1% Triton X-100。
- 6.1.10 MgSO_4 溶液：150 mmol/L。
- 6.1.11 甜菜碱溶液：5 mol/L。
- 6.1.12 酚红溶液：10%。
- 6.1.13 引物：内源基因、CP4-EPSPS、G2-EPSPS和G10evo-EPSPS环介导等温扩增（LAMP）检测方法作用引物见表1。

表1 LAMP反应引物序列

序号	基因名称	引物序列（5'-3'）	
1	内源基因	F3	TCTCTCTCTCTCCCTAGCCT
		B3	GGGGTAGCATAAAGGGCAC
		FIP	GCGTGGGGAAAACCTTGCTGACGCTACTCACCAAGGCAAACCT
		BIP(B1c+B2)	TGCTGCTATCTCACCCCTCCGGCCTAGGGATCCCGTCGTT
2	CP4-EPSPS	F3	CGTACCATCCGTCTTGAAGG
		B3	AGACGTGGGTTGATCACTTC
		FIP(F1c+F2)	GCAGCAACCAATGGGAAAGCGAGTGGTAAGCTCACCGGTCA
		BIP(B1c+B2)	CAGGTTCCGACGTCACCATCCCACCCATTTCTGCAGAGTC
3	G2-EPSPS	F3	GCACGCTTTATCGTTGACGT
		B3	CGGTCACGGTTTTCTGCG
		FIP(F1c+F2)	AACACGCCATGCTTGTCGAGTGTGCGAGCAAGCTCTGC
		BIP(B1c+B2)	GCCTGATGATTCGGGTCCGCCTCAAGGTACAAGGCTCCTG
4	G10evo-EPSPS	F3	GACCACCAGGGATGGAGAT
		B3	TCCGTTTCCGGTCCAGTT
		FIP(F1c+F2)	TCCCACGCTCCTCTTAGACAGACTTCTAAGGTCATCGGAGGC
		BIP(B1c+B2)	TCCGTCAGGAAGAAGAGGACCGGTTTCCGCCGAAAGATCCT

6.2 溶液配制

6.2.1 裂解液：量取10 mL 1 M Tris-HCl (pH 8.0) (6.1.1)、0.8 mL 0.5M EDTA (pH 8.0) (6.1.2)，称取81.86 g NaCl (6.1.3)、2 g CTAB (6.1.4) 加入烧杯中，加入约800 mL水，搅拌溶解。用盐酸 (6.1.5) 或NaOH (6.1.6) 调节pH至8.0，加水定容至1 L，混匀。

6.2.2 复溶液：量取10 mL 10 M Tris-HCl (pH 8.0) (6.1.2)、2 mL 0.5M EDTA (pH 8.0) (6.1.3)，加入烧杯中，加入800 mL水，搅拌混匀。用盐酸 (6.1.5) 或NaOH (6.1.6) 调节pH至8.0，加水定容至1 L，混匀。

6.2.3 扩增反应液：内源基因、CP4-EPSPS、G2-EPSPS和G10evo-EPSPS环介导等温扩增(LAMP) 反应液配制见表2。分别配制各检测基因扩增反应液后按照25 µl/管分装至0.2 mL离心管中，-80 °C 快速冷冻30 min，预冷冻后的试剂转移至冻干机-40 °C 保持2 h，启动真空泵将压力降至0.1 mBar以下，缓慢升温 (0.5 °C/min) 至-20 °C，使冰晶逐渐升华。再将温度 (0.2 °C/min) 逐渐升至20 °C，保持真空状态2 h后关闭真空泵，充入惰性气体恢复常压。取出冻干后的试剂，盖上离心管盖。

表2 LAMP 反应液配制体系

组分	工作液浓度	加样量/ µL	反应体系终浓度
10×ThermoPol Reaction Buffer	-	2.5	1
外侧上游引物 (F3)	10 µmol/L	0.5	0.2 µmol/L
外侧下游引物 (B3)	10 µmol/L	0.5	0.2 µmol/L
内侧上游引物 (FIP)	40 µmol/L	1	1.6 µmol/L
内侧下游引物 (BIP)	40 µmol/L	1	1.6 µmol/L
dNTPs	10 mmol/L	2	0.8 mmol/L
甜菜碱	5 mol/L	5	1.0 mmol/L
MgSO4	150 mmol/L	1	6 mmol/L
Bst DNA 聚合酶	8 U/µL	1	0.32 U/µL
酚红	10%	0.5	0.2%
水	-	补足至 25	-

7 样品制备

7.1 抽样和制样

粮食样品扦样采样操作按照GB/T 5491进行，采集样品的制备按照GB/T 19495.7进行。

7.2 样品前处理

7.2.1 裂解：取 $0.20\text{ g}\pm 0.05\text{ g}$ 籽粒粉末于5 mL离心管中，加4 mL裂解液（6.2.1），上下颠倒混匀（或涡旋混匀30 s），此为样品裂解液。

7.2.2 复溶：取25 μL 样品裂解液（7.2.1）加入一个新的1.5 mL的离心管中，再向离心管中加入1 mL复溶液（6.2.2），上下颠倒混匀（或涡旋混匀30 s），备用。此为样品复溶液。

8 样品测定

8.1 试液配制

更换移液器吸头，取25 μL 样品复溶液（7.2.2）加入提前准备好扩增反应液（6.2.3）的冻干管中，换4联管盖，盖紧管盖后上下颠倒混匀（或涡旋混匀30 s），用手将液体甩至管底（注意液体不要有气泡）。

8.2 核酸扩增

将试液（8.1）置于65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅（5.1）中恒温扩增30 min，反应结束。

8.3 结果判定

8.3.1 质量控制

内源基因检测试剂应为黄色或橘黄色，如不符合应重新进行试验。

8.3.2 结果判断

内源基因检测试剂为黄色或橘黄色，外源基因检测试剂为红色时，判定该样品不含所检基因，可表述为“未检出 $\times\times\times$ 基因”。

内源基因检测试剂为黄色或橘黄色，外源基因检测试剂为黄色或橘黄色时，判定该样品含有所检基因，应按照GB/T 19495.4标准确证实验结果，再根据确证结果判断和表述。